

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-180997

(43)Date of publication of application : 06.07.1999

(51)Int.Cl.

C07K 5/062
A61K 38/00
// C07D277/28
C12P 21/02
(C12P 21/02
C12R 1:645)

(21)Application number : 09-354788

(71)Applicant : YAMANOUCI PHARMACEUT CO
LTD

(22)Date of filing : 24.12.1997

(72)Inventor : HAYATA KINYA
TAKEBAYASHI YUKIHIRO
NAGAI KOJI
HIRAMOTO MASASHI

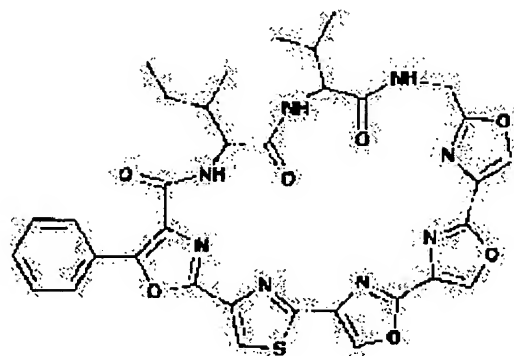
(54) NOVEL ANTITUMOR COMPOUND

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a novel peptide and its salts that have excellent antitumor action.

SOLUTION: This peptide is represented by the formula.

The compound of the formula is obtained by culturing *Streptomyces nobilis* (for example, JCM 4274 strain or the like) in a culture medium containing L-arabinose, meat essence and the like at a pH of 6-8, at a temperature of 25-30°C under aerobic conditions. The daily dose of the peptide of the formula is preferably in the range of 50-200 mg/adult.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

特開平11-180997

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 0 7 K 5/062		C 0 7 K 5/062	
A 6 1 K 38/00	ADU	C 0 7 D 277/28	
// C 0 7 D 277/28		C 1 2 P 21/02	A
C 1 2 P 21/02		A 6 1 K 37/02	ADU
(C 1 2 P 21/02			

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-354788

(22) 出願日 平成9年(1997)12月24日

(71) 出願人 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(72) 発明者 早田 錦矢

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 竹林 幸弘

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 永井 浩二

東京都板橋区小豆沢1-1-8 山之内製薬株式会社内

(74) 代理人 弁理士 長井 省三 (外2名)

最終頁に続く

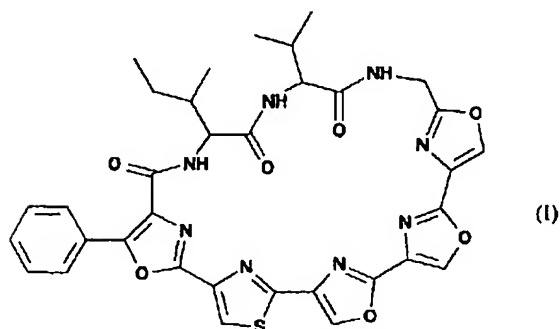
(54) 【発明の名称】 新規抗腫瘍化合物

(57) 【要約】

【課題】 抗腫瘍作用を有する新規ペプチド化合物及び医薬、特に抗腫瘍剤の提供

【解決手段】 式

【化1】

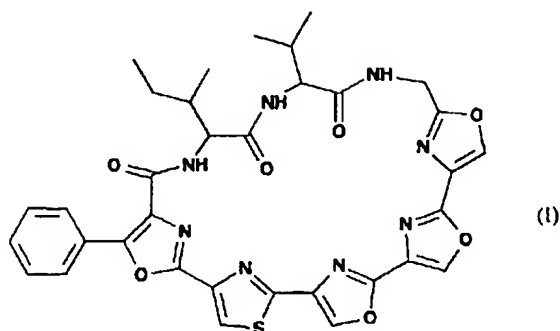


で示される新規ペプチド化合物及びその塩、又は本発明化合物を有効成分とする医薬及び抗腫瘍剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】式（I）

【化1】



で示されるペプチド化合物又はその塩。

【請求項2】請求項1記載の化合物を有効成分として含有することを特徴とする医薬。

【請求項3】抗腫瘍剤である請求項2記載の医薬。

【0001】

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】本発明は医薬、特に抗腫瘍剤として有用な新規ペプチド化合物及びその塩、並びにこれらを有効成分とする医薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】微生物代謝産物由来の抗腫瘍物質は、すでに数多く報告されており、マイトマイシンC、プレオマイシン、ネオカルチノスタチン、ダウノマイシン、アドリアマイシン、アクチノマイシンDなどが報告されている。しかしながら、本発明化合物または、本発明化合物に類似する物質に関する報告はなされていない。

【0003】

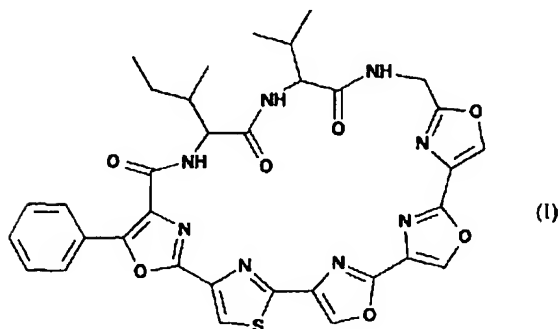
【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、優れた新規抗腫瘍化合物を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、微生物が産生する抗腫瘍作用物質につき、鋭意探索、研究した結果、ストレプトマイセス属に属する微生物が下記式

（I）によって示される新規なペプチド化合物又はその塩を産生すること、該化合物が優れた抗腫瘍作用を有することを知見して本発明を完成させるに至った。

【化2】



即ち、本発明は式（I）で示されるペプチド化合物又はその塩に関する。また、本発明によれば、上記ペプチド化合物（I）又はその塩を有効成分として含有する医薬、特に抗腫瘍剤が提供される。

【0005】（化合物）本発明化合物（I）は酸付加塩を形成する。化合物（I）は通常の培養条件、単離条件では遊離塩基として単離されるが、条件によってはその酸付加塩として産生或いは単離することもできる。また、遊離塩基を通常の造塩反応に付して酸付加塩を製造することもできる。かかる塩としては具体的には塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、磷酸等の鉱酸、炭酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸等の有機酸、アスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸との酸付加塩が挙げられる。

【0006】本発明化合物（I）は不斉炭素原子を有しており、光学異性体（ラセミ体、光学対掌体、光学活性酸との酸付加塩にあってはジアステレオマー）が存在する。本発明にはこれらの光学異性体の分離されたもの及びその混合物の全てが包含される。また、本発明化合物は単離条件によっては、水和物、各種の溶媒和物として単離されたり、結晶多形を有する場合も考えられ、本発明の化合物としてはこれらの水和物、各種の溶媒和物、全ての結晶形の化合物も包含される。

【0007】（微生物）本発明化合物を生産する放線菌ストレプトマイセス ノビリスは、公的保存機関から入手可能であり、例えば理化学研究所の保存菌（JCM4274株）などの菌が使用できる。ストレプトマイセス ノビリスの培養は一般微生物の培養方法に準じて行われる。

【0008】（生産方法）培養に用いられる培地としては、ストレプトマイセス ノビリスが利用する栄養源を含有する培地であればよく、合成培地、半合成培地または天然培地が用いられる。培地の組成は、例えば炭素源としてはL-アラビノース、D-キシロース、D-グルコース、D-フラクトース、シュクロース、イノシトール、L-ラムノース、ラフィノース、D-マンニトール、マンノース、メリビオース、ラクトース、D-ガラクトース、マルトース、トレハロース、サリシン、キサンチン、キチン、デンプン、ブドウ糖、デキストリン、グリセリン、植物油等が、窒素源としては肉エキス、ペプトン、グルテンミール、綿実粕、大豆粉、落花生粉、魚粉、コーンステープリカー、乾燥酵母、酵母エキス、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿酸その他の有機、無機の窒素源が用いられる。また、金属塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、鉄、コバルトなどの硫酸塩、硝酸塩、炭酸塩、リン酸塩などが必要に応じて添加される。さらに、必要に応じてメチオニン、システイン、シ

スチン、チオ硫酸塩、オレイン酸メチル、ラード油、シリコン油、界面活性剤などの生成促進物質または消泡剤を添加することもできる。

【0009】培養法としては、液体培養法、特に深部攪拌培養法が適している。培養温度は15～40℃の範囲、好ましくは25～30℃で行われる。培地のpHは4～10、好ましくは6～8で行われる。培養期間は培地の組成、温度条件に応じて適宜設定されるが、通常1～14日程度である。培養物より本発明化合物を単離精製するには通常の微生物の培養物より生理活性物質を単離精製する方法が適用される。例えば、培養物を濾過により培養濾液と菌体に分け、菌体をアセトンなどで抽出する。抽出物を培養濾液と併せて酢酸エチルなどで抽出し、さらにシリカゲルによるカラムクロマトフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、再結晶などにより本発明化合物を得る。

【0010】（効果）

〔HeLa S3細胞に対する増殖阻害作用〕 DMSOにて適宜希

釈した試験化合物を含むDMSO溶液2μlずつを96穴プレートの各wellに添加し、10%牛胎児血清を含むMEM培地で5～7×10⁴個/mlに調製したHeLa S3細胞を200μlずつ分注し、CO₂インキュベーター内で37℃、3日間培養した。その後、細胞増殖に対する作用をCell Counting Kit（同仁化学研究所製）を用いた方法により検討した。すなわち、試験化合物を含む培地を除去後、培地を100μlずつ分注し、試薬A（WST-1 16.3mg、HEPES 23.8mg）と試薬B（0.2mM 1-Methoxy PMS溶液 5ml）を混合した試薬溶液10μlずつを添加し、CO₂インキュベーター内で37℃、4時間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダーにより測定波長415 nm、参照波長630 nmで測定し、非処理細胞と既知濃度の試験化合物で処理した細胞の吸光度を比較することにより、細胞の増殖を50%阻害する試験化合物濃度（IC₅₀）を求めた。結果を下に示す。

【0011】

【表1】

試験細胞	細胞増殖阻害活性 IC ₅₀ (nM)
HeLa S3	14

【0012】本発明化合物又はその塩の1種又は2種以上を有効成分として含有する製剤は、通常製剤化に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。製剤用の担体や賦形剤としては、固体又は液体いづれでも良く、例えば乳糖、ステアリン酸マグネシウム、スターチ、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコール等やその他常用のものが挙げられる。投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、あるいは静注、筋注等の注射剤、坐剤、経皮等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。投与量は症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定されるが、通常成人1人当たり、1日につき1～1,000mg、好ましくは50～200mgの範囲で1日1回から数回に分け経口投与されるか又は成人1人当たり、1日につき1～500mgの範囲で、1日1回から数回に分け静脈内投与されるか、又は、1日1時間～24時間の範囲で静脈内持続投与される。もちろん前記したように、投与量は種々の条件で変動するので、上記投与量範囲より少ない量で十分な場合もある。

【0013】本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロ

リドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤や繊維素グルコール酸カルシウムのような崩壊剤、ラクトースのような安定化剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸のような溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の糖衣又は胃溶性あるいは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよい。

【0014】経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば注射用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等がある。このような組成物はさらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ラクトース）、溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通

す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。また、これらは無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

【0015】

【実施例】実施例1

グルコース 10 g、ポテトスターチ 20 g、ポリペプトン 5 g、酵母エキス 5 g、炭酸カルシウム 4 g、蒸留水 1 L を含む培地 (pH 7.0) を 100 ml ずつ 500 ml 容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。ベネット寒地培地に良く生育させたストレプトマイセス ノビリス (*Streptomyces nobilis*) JCM 4274 株をかき取って接種し、28℃、200回転/分の条件で4日間振とう培養し、種培養液とした。次にポテトスターチ 30 g、酵母エキス 15 g、リン酸二水素カリウム 0.5 g、硫酸マグネシウム七水和物 0.5 g、炭酸カルシウム 2 g、蒸留水 1 L を含む培地 (pH 7.0) を 100 ml ずつ 500 ml 容三角フラスコに25本分注し、120℃、20分間滅菌した。

性状：白色粉末

質量分析：positive ion FAB-MS $m/z = 719 [M+Na]^+$

negative ion FAB-MS $m/z = 695 [M-H]^-$

高分解能MARDI-TOFMS found : $m/z = 719.2059 [M+Na]^+$

calcd for : $m/z = 719.2012 [M+Na]^+$

分子式： $C_{34}H_{32}N_8O_7S$

紫外吸収スペクトル λ_{max} nm (ϵ) : 261 (31000), 273 (31200), 287 (32000), 322 (8700, sh) in CH_3CN

赤外吸収スペクトル ν_{max} cm^{-1} (KBr) : 3470, 3390, 3290, 1660, 1570, 1510, 1110

^{13}C NMRスペクトル (125Hz, $DMSO-d_6$) : 170.8, 170.2, 163.0, 160.3, 157.5, 155.5, 155.0, 154.1, 150.6, 141.5, 139.6, 139.4, 139.1, 135.6, 130.8, 130.0, 129.9, 129.1, 128.6 ($\times 2$), 127.5 ($\times 2$), 126.7, 122.2, 57.5, 57.1, 38.8, 35.2, 31.5, 25.6, 19.7, 17.4, 14.7, 12.1

1H NMRスペクトル (500Hz, $DMSO-d_6$) : 9.07 (1H, s), 8.98 (1H, s), 8.89 (1H, s), 8.67 (1H, dd), 8.65 (1H, s), 8.57 (1H, d), 8.35 (2H, d), 8.22 (1H, d), 7.57 (2H, t), 7.52 (1H, t), 5.05, 4.19 (2H, dd), 4.82 (1H, dd), 4.60 (1H, dd), 2.14 (1H, m), 2.09 (1H, m), 1.66, 1.09 (2H, m), 0.97 (3H, d), 0.95 (3H, d), 0.93 (3H, d), 0.91 (3H, t)

溶解性：ジメチルスルホキシド、クロロホルム、アセト

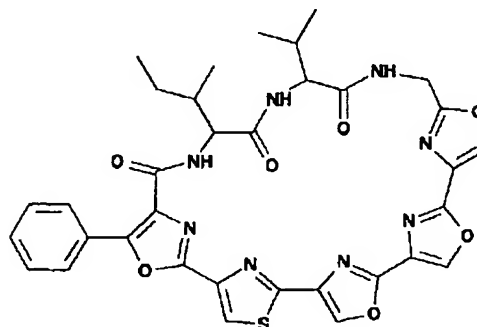
この培地に前記種培養液を 2 ml ずつ接種し、28℃、200回転/分の条件で8日間振とう培養した。培養物を濾過により培養濾液と菌体に分け、菌体をアセトンで抽出した。アセトン抽出物を濃縮し、培養濾液と併せて酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出物を濃縮乾固し、ヘキサンに溶解した後、ヘキサン相をメタノールで抽出した。ヘキサン不溶物とメタノール抽出物を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲルカラム (シリカゲル 60、メルク) を用い、ヘキサノン-酢酸エチル混合溶液、クロロホルム-メタノール混合溶液 (ステップワイズ法) で展開、分画した。得られた溶出画分をODSカラムを用い、メタノール-水混合溶液で展開、分画した。得られた溶出画分を濃縮後、少量のメタノールに溶解して再結晶を行い、一部を逆相HPLCカラム (PEGASIL-ODS、センシュー科学) による精製を行うことにより本発明化合物 70 mg を得た。本発明化合物の物理科学的性質は、以下に示す通りである。

【0016】

ニトリルに可溶、水に難溶。

【0017】これらの物理科学的性状から以下の構造が特定された。

【化3】



【0018】

【発明の効果】本発明のペプチド化合物やその塩は、腫瘍細胞増殖抑制作用を有し、抗腫瘍剤として有用である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

C12R 1:645)

識別記号

F I

(72)発明者 平本 昌志

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株
式会社内